

PATENTE DE INVENCION

Case 4 - 9157 / +

432845

Int. Cl.: C07C

Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACION DE CALCITONINAS

Solicitante: CIBA-GEIGY AG., entidad suiza, residente en Basilea,
Suiza.

En la obtención de péptidos de cadena larga sintéticos a partir de fragmentos de péptidos se forman por lo general cantidades más o menos considerables de productos secundarios que resultan difíciles de separar. Así se pueden presentar en la cadena de aminoácido restos de

aminoácido en forma de diastereómeros, por ejemplo, en la síntesis descrita por Sieber et al. (Helv. Chim. Acta 53, 2135 - 2150 (1970)) de la calcitonina humana los restos de aminoácido Leu⁴, Leu⁹, Thr⁶, Phe¹⁶ e His²⁰. Además, en los péptidos que contienen azufre se puede presentar una alquilación ó una migración N \longrightarrow O-acilo, tal y como se describe asimismo en la publicación indicada. Para separar estos productos secundarios se realizan, bien en la etapa con el mayor número de fragmentos protegidos y/o en la etapa del péptido total protegido y/o en el mismo producto final, costosas operaciones de purificación, tales como de distribución en contracorriente, electroforesis o cromatografía. Estas recargan la obtención de tales péptidos de cadena larga en escala industrial, pues se precisan de grandes cantidades de absorbentes y/o disolventes que son muy difíciles de regenerar ó bien solo bajo gastos considerables.

Se ha hallado ahora un procedimiento de purificación muy sencillo para los péptidos del tipo de la calcitonina con un punto isoeléctrico que se encuentra entre los valores pH de unos 5 a 10 (es decir, p.I. = unos 5 - 10). Este se caracteriza porque el péptido de calcitonina se precipita de una solución acuosa de una sal con ácidos o bases mediante ajuste del pH al margen isoeléctrico como sal interna. La expresión "margen" isoeléctrico se emplea ya que en los presentes compuestos el punto isoeléctrico no está exactamente definido y éste se extiende a través de un margen pH más amplio, véase Kortüm, Lehrbuch der Elektrochemie, Editorial Chemie, Weinheim, 1966, pág. 336. Bajo margen isoeléctrico entendemos nosotros el margen pH de $pI \pm$ aproximadamen-

te 1 unidad pH.

Sorprendentemente se obtiene en esta precipitación el péptido en gran pureza, ya que los productos secundarios arriba mencionados no se precipitan al mismo tiempo, ó bien en el caso de los derivados de O-acilo, estos se vuelven a transformar en los derivados de N-acilo. El grado de pureza de los productos sobrepasa a aquellos de los péptidos purificados por doble distribución en contracorriente, esto es en la etapa previa protegida y en el producto final (véase por ejemplo, Helv. Chim. Acta 53, 2135 (1970)). También se pueden obtener calcitoninas de alta pureza cuando la etapa previa protegida (dotriacontapeptidoamida protegida) no se ha purificado por distribución en contracorriente, etc., sino solo por disolución y precipitación. Las pérdidas por la operación de purificación son inferiores a las de los demás procedimientos. El producto obtenido muestra una actividad biológica total.

Este método no era de prever, pues otros péptidos de cadena larga, tales como, por ejemplo, ACTH, insulina, glucagons no se pueden purificar de esta manera.

Como péptidos del tipo calcitonina con un punto isoeléctrico de pI = unos 5 - 10 son de mencionar, en primer lugar, la calcitonina humana (calcitonina M) y sus derivados y análogos, por ejemplo, aquellos que se describen en las patentes belgas nº 737,890, nº 740,256, nº 757,786 y en la solicitud de patente suiza nº 4454/73. Análogos son, ante todo, aquellos que en lugar de metionina⁸ contienen un ácido α -alquilo inferior- α -aminoacético, especialmente aquella donde el alquilo inferior muestra 2 - 4 átomos de carbono, especialmente valina, además, norvalina, leucina, iso-

leucina, norleucina ó ácido α -aminobutírico. Otros amino-ácidos de intercambio preferentes, que también pueden estar presentes en la posición 8 junto con los aminoácidos de intercambio mencionados son L-lisina¹¹, L-leucina¹², L-leucina¹⁶, L-leucina¹⁹, L-tirosina²², L-asparagina²⁶ y L-treonina²⁷. Los derivados son, ante todo, los correspondientes desamino¹-péptidos así como derivados de N ^{α} -amilo.

Los grupos acilo para la acilación del grupo N ^{α} -amino son los restos de ácidos carboxílicos, tales como ácidos carboxílicos alifáticos, aromáticos, aralifáticos, heterocíclicos o heterocíclico-alifáticos, especialmente de ácidos alcano ó alqueno inferiores, mono ó divalentes, ante todo los ácidos alcano inferior con 1 - 4 átomos de carbono, tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácidos butíricos, además, ácido acrílico, ácido succínico, de ácidos carboxílicos alicíclicos, tales como ácidos cicloalquilcarboxílicos, tal como ácido benzoico o ftálico insustituido y sustituido, de ácidos aril-arilo sustituido-alquilo inferior ó alquenil-carboxílicos, tales como ácido fenilacético, de ácidos insustituídos o sustituidos, mono- ó divalentes, de 5 a 6 miembros, heterocíclicos, con nitrógeno, azufre y/u oxígeno como heteroátomos, tales como ácidos piridincarboxílicos, ácidos tiofencarboxílicos, ó de ácidos heterocíclico-alcano inferior, tales como ácido piridinacético, ácido imidazolilacético, donde los sustituyentes del anillo son, por ejemplo, átomos de halógeno, grupos nitro, grupos alquilo inferior ó grupos alcoxi inferior ó grupos carbalcoxi inferior. Además son de mencionar como restos acilo, ante todo los restos acilo de aminoácidos, especialmente de α -aminoácidos, tales como, por ejemplo, glicilo; L-leucilo, L-pi-

roglutamilo, además, los restos acilo que se derivan del ácido carbónico o del ácido tiocarbónico ó bien sus esteres o amidas, por ejemplo, grupos de alquilo inferior-carbonilo, tales como etoxicarbonilo, terc.butiloxicarbonilo, además, benzoiloxicarbonilo insustituido y sustituido como arriba indicado, carbamoilo y tiocarbamoilo, así como carbamoilo N-sustituido y tiocarbamoilo, por ejemplo, N-alquilo inferior-carbamoilo, N-fenilcarbamoilo, N-fenil-tiocarbamoilo.

La calcitonina humana muestra un margen isoeléctrico de 7 - 8. La variación del margen isoeléctrico al sustituir aminoácidos individuales por otros se puede determinar experimentalmente, por ejemplo, electroforéticamente, o también ser calculado. El punto isoeléctrico de los péptidos se puede calcular, por ejemplo, según J. Greenstein and M. Winitz "Chemistry of the Amino Acids", Vol. 1, Ed. John Wiley and Sons, Inc., New York, London, 1961, pág. 482 y s.

Como sales de los péptidos que se pueden emplear en el nuevo procedimiento como producto de partida entran en consideración todas las sales que son solubles en agua o en caso dado en una solución de agua y un disolvente de péptido orgánico, por ejemplo, alcanoles inferiores, especialmente metanol, etanol, isopropanol, terc.butanol, ó dimetilformamida ó dimetilacetamida. Tales sales son, por ejemplo las sales de ácidos minerales, especialmente los hidrácidos halogenados, ó de ácidos orgánicos, ante todo ácido acético y ácidos acéticos halogenados, tales como ácido trifluoracético, ácido dicloroacético, además, ácidos sulfónicos, tales como ácidos alcano inferior-sulfónicos, por ejemplo, ácido metanosulfónico, ó ácidos benceno- ó toluenosulfónicos. El péptido se puede emplear también como sal con ba-

ses, por ejemplo, con amoniaco ó con aminos primarias, secundarias, terciarias o cuaternarias, por ejemplo, aminos correspondientes que como restos orgánicos contienen uno o más restos de alquilo inferior, cicloalquilo (preferentemente con 5 - 6 átomos de anillo) ó aralquilo, especialmente restos de fenil-alquilo inferior, por ejemplo, trietilamina, ciclohexilamina, diciticlohexilamina, bencilamina, hidróxido trimetilbencilamónico, además, con guanidina sustituida por uno de los restos orgánicos mencionados, por ejemplo, tetrametilguanidina. En primer lugar se emplea el péptido en forma de aquella sal en la que se obtiene de la síntesis, por ejemplo, en forma del hidrocioruro, del hidrobromuro, del hidrofioruro, del trifloracetato ó acetato. Si se desea, las sales en las que se obtiene el péptido se pueden transformar antes de la operación de limpieza, en la sal ácido acética, por ejemplo, por intercambiador de iones.

La sal se disuelve en agua o en una solución de agua y un disolvente de péptido orgánico. Se mide el pH y se agrega, según este presente una sal con un ácido o con una base cuidadosamente base o ácido hasta que se alcance el margen isoelectrónico. Como bases se emplean, por ejemplo, amoniaco, alcali acuoso, especialmente lejía sódica o lejía potásica, carbonatos o hidrogenocarbonatos alcalinos, por ejemplo, carbonato ó bicarbonato sódico, bases orgánicas como las aminos arriba mencionadas ó, preferentemente, intercambiadores de iones básicos. Son adecuados los intercambiadores de iones ligeramente básicos, aquellos de basicidad media y fuertemente básicos. Tales intercambiadores de iones se pueden obtener por polimerización de cuerpos básicos adecuados o por introducción de grupos básicos en polímeros.

Ventajosamente se emplean productos que se obtienen en el mercado, por ejemplo, aquellos a base de celulosa, tales como DEAE-Cellulose ó DEAE-Sephadex. Son especialmente adecuados los intercambiadores de iones a base de poliestireno que distintas fármacos ponen en el mercado bajo distintos nombres de marca, por ejemplo, el intercambiador de iones debilmente básico de Merck nº II ó el intercambiador fuertemente básico de Merck nº III ó las distintas formas comerciales de los intercambiadores de iones básicos Dowex o de las amberlitas básicas. En caso de que el margen isoeléctrico se haya de ajustar mediante ácidos se emplean, por ejemplo, ácidos minerales, ante todo hidrácidos halogenados, especialmente el ácido clorhídrico, ó ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido acético o ácido cítrico, o intercambiadores de iones ácidos correspondientes a los intercambiadores de iones básicos arriba mencionados, por ejemplo, aquellos a base de poliestireno tales como "Amberlite" IR-120 ó "Dowex" 50.

Cuando se ha alcanzado el margen isoeléctrico comienza lentamente la precipitación del péptido. La precipitación se deja completar durante varias horas, por ejemplo durante dos horas. Durante este periodo de tiempo sube el valor pH en aproximadamente una unidad. Así asciende por ejemplo el pH del acetato de calcitonina M aproximadamente a 4. Al agregar intercambiador de iones ligeramente básico aumenta este lentamente a 6,0 a 6,2. Aquí comienza la precipitación. En el transcurso de otras 2 horas aumenta el pH a unos 7,5, pero entonces se mantiene constante.

Completada la precipitación del péptido éste se separa, por ejemplo, por succión o centrifugación, y lava ulteriormente a fondo con agua. Como el péptido precipitado se

disuelve muy difícilmente en agua practicamente no se presentan pérdidas en la práctica. Si se ha precipitado mediante adición de intercambiadores de iones se ha de separar el péptido libre del intercambiador de iones. Esto se puede realizar, por ejemplo, transformando el péptido mediante ácido en una sal deseada, por ejemplo, en el acetato o hidrocloruro, y la solución se separa, por ejemplo, por filtración o succión del intercambiador de iones y se liofiliza. Si se ha trabajado sin intercambiador de iones entonces se puede, si se desea, transformar el producto precipitado por disolución en ácido y liofilización en la forma de sal deseada.

Acidos que son adecuados para la formación de sales de aplicación terapéutica son, por ejemplo, ácidos inorgánicos, tales como hidrácidos halogenados, por ejemplo, ácido clorhídrico o bromhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico ó ácido tiociánico, ácidos sulfúricos o fosfóricos, ó ácidos orgánicos, tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maléico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido hidroximaléico, ácido dihidroximaléico, ácido benzoico, ácido fenilacético, ácido 4-aminobenzoico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido antranílico, ácido cinamónico, ácido mandélico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido 2-fenoxibenzoico, ácido 2-etoxibenzoico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalinsulfónico ó ácido sulfanílico.

Los péptidos obtenidos según el presente procedimiento se pueden emplear en forma de preparados farmacéuticos

cos. Estos contienen los péptidos en mezcla con un material excipiente orgánico o inorgánico, farmacéutico, adecuado, por ejemplo, para la aplicación intravenosa, intramuscular, subcutánea o intranasal. Como tales entran en consideración aque-
5 llas sustancias que no reaccionen con los polipéptidos, tales como, por ejemplo, gelatina, agar-agar, traganta, celulosa, por ejemplo, "Avicel" (celulosa microcristalina) y derivados de la celulosa tal como celulosa carboximetilica, é-
10 ter de celulosa, tal como celulosa metilica o etilica, polialquilen-glicoles, tales como propilenglicoles, agua, alcoholes mono- ó polivalentes, tales como etanol, isopropanol, glicerina, hexitas, aceites vegetales y otros ésteres de ácido graso, tal como aceite de aráquida, aceite de semilla de algodón, aceite de almendras, aceite de oliva, aceite de ricino, oleato etílico, miristato isopropílico, palmitato isopropílico, "Cetiol V" (éster de ácido oléico de alcoholes grasos líquidos), "Miglyol" ó "Labrafac" (mezcla de triglicéridos de ácidos grasos con 8 - 12 átomos de carbono),
15 "Labrafil M 2735" ó "Labrafac WL 1219" (mezclas de glicerina y ésteres polioxietilénicos de ácidos grasos), "Arlacel" (éster sorbitánico de ácido graso), "Tween" (monocoleato de sorbitano polioxietilénico), aceites de silicona, tal como aceite de silicona dimetilica, u otros excipientes medicina-
20 les conocidos. Los preparados farmacéuticos se pueden presentar, por ejemplo, como liofilizado o en forma líquida como
25 soluciones, suspensiones, emulsiones o sprays, véase por ejemplo, la publicación alemana DOS 2 212 315. En caso dado estarán esterilizados y/o contendrán agentes auxiliares, tales como agentes de conservación, de estabilización, humectación o emulsión. Asimismo pueden contener otras sustancias
30

terapéuticamente valiosas.

La invención se describe en los ejemplos siguientes. Las temperaturas se indican en grados centígrados.

En la cromatografía de capa delgada se emplean los sistemas siguientes:

5

Sistema 43C: alcohol terc.amílico-isopropanol-agua (51:21:28)

Sistema 45: sec.butanol-amoniaco acuoso al 3 % (70 : 30)

Sistema 52: n-butanol-ácido acético glacial-agua (75:7,5:21)

Sistema 52A: n-butanol-ácido acético glacial-agua (67:10:23)

10

Sistema 70: acetato de etilo-piridina-agua (40:20:40), fase superior

Sistema 79: n-butanol-piridina-agua (34:33:33)

Sistema 96: sec.butanol-ácido acético glacial-agua (67:10:23)

Sistema 100: acetato de etilo-piridina-ácido acético glacial-agua (62:21:6:11)

15

Sistema 101A: n-butanol-piridina-ácido acético glacial-agua (42:24:4:30)

Sistema 102A: acetato de etilo-metiletiletona-ácido fórmico-agua (50:30:10:10)

20

Sistema 107: acetato de etilo-piridina-agua (49:24:27)

Sistema 114: sec.butanol-metiletiletona-NH₃ acuoso al 25 % - agua (37:37:13:13)

Sistema 121: isopropanol-NH₃ acuoso al 25 % - agua (70:10:20)

Sistema 121A: isopropanol - NH₃ acuoso al 25 % - agua (85:5:10)

25

DS: sobre placas terminadas de gel de sílice SL 254 de la firma Antec, Birsfelden.

DC: sobre placas terminadas de la firma Merck, Darmstadt

DA: sobre placas Alox (45 g Al₂O₃ de la firma Camag, Muttenz, + 3,5 g de yeso, espesor 0,3 mm).

30

En los ejemplos se emplean las siguientes abreviaciones:

	Boc	terc.butiloxicarbonilo
	Z	carbобенzoxi
5	OtBu	éster terc.butílico
	ONp	éster p-nitrofenílico
	OMe	éster metílico
	OSu	éster hidroxisuccinimídico
	tBu	terc.butiléter
10	DMF	dimetilformamida

Ejemplo 1

Acetato de calcitonina M puro

50 mg de sal trifluoracética de calcitonina M (patente belga 737 890) se disuelven en 5 cc de agua. El pH de la solución asciende a 2,5. Bajo agitación se agregan en el plazo de 15 minutos, en varias porciones, en total 0,6 cc de intercambiador de iones Merck nº II, debilmente básico, forma de base libre. Se eleva así el pH de la solución a 6,2. Se sigue agitando durante otros 30 minutos a temperatura ambiente con lo que el pH se eleva a 7,5 y se presenta un precipitado coposo. Después de agitar durante 3 horas el precipitado y el intercambiador de iones se separan por succión y se lava ulteriormente con agua. El agua de lavado contiene 12 mg de productos secundarios de la calcitonina M.

La calcitonina M precipitada se separa del intercambiador de iones lavando 4 veces, cada una con 4 cc de ácido acético al 90 % y en cada caso separación por succión. Los extractos ácido acéticos reunidos se liofilizan y se obtienen 36 mg de calcitonina M como sal ácido acética. El pro-

ducto tiene los siguientes datos analíticos:

Contenido en agua según Karl Fischer: 8,1 %

Contenido en ácido acético (cromatográficamente): 1,1 %

Contenido en péptidos: 89,0 %

5 Contenido en flúor (microanalíticamente): 0,02 %

Análisis del aminoácido:(6-N. HCl, 24 h, 110°): todos los aminoácidos en la proporción molar correcta, excepto Ser, Thr, Cys, que se destruyen parcialmente en la hidrólisis);

10 Espectro ultravioleta (en ácido acético al 10 %): $\lambda_{\max} = 275 \text{ nm}$, $\epsilon = 1540$.

Ejemplo 2

Trihidrocloruro de calcitonina M puro

1. Trifluoracetato de calcitonina M, en bruto

15 58,0 g de Boc-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asb-Lys(Boc)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ (14,3 mmoles) se disuelven bajo nitrógeno en 700 cc de ácido trifluoroacético al 85 %. Esta
20 solución se deja durante 2 horas a 30°. A continuación se agita en 6 litros de éter libre de peróxido bajo buen enfriamiento con hielo. El precipitado se separa por filtración, se lava con éter y se seca en alto vacío. Se obtiene el trifluoracetato de calcitonina M en bruto como polvo incoloro.

25 2. Sal interna de calcitonina M

43,5 g del trifluoracetato de calcitonina M en bruto obtenida según 1 se disuelven en 1 litro de ácido acético al 1 %, se filtra a través de un filtro de vacío de vidrio G-4 y con amoníaco se precipita como sigue: La solu-

ción se agita bajo nitrógeno a temperatura ambiente midiéndose el pH en forma continua mediante un electrodo de vidrio. Se agrega lentamente solución de amoníaco aproximadamente 1-n ($t = 0,97$) de manera que después de 1,25 horas se haya alcanzado un pH de 5. En el plazo de una hora más aproximadamente se eleva el pH a 6 mediante la alimentación igualada de más solución de amoníaco aproximadamente 1-n. Comienza así a precipitarse la sal interna de calcitonina M como polvo insoluble. Se continua la lenta adición de solución de amoníaco hasta que en el plazo de aproximadamente otra hora se ha alcanzado el pH de 7,6. A continuación se agita aún durante 3 horas con lo que el pH casi no se varía más. Se filtra, se lava con amoníaco diluido del pH 7,6 y se seca en alto vacío. Se obtienen 18,9 g de un polvo insoluble en agua. La determinación del ácido acético por cromatografía de gas de una muestra así obtenida da un valor de 0,3 % en peso de ácido acético (corresponde a unos 0,17 mol-%).

3. Trihidrocloruro de calcitonina M

27,3 g (8,0 mmoles) de sal interna de calcitonina M se suspenden en 700 cc de t-butanol. Se agregan 250 cc de agua y 360 cc de ácido clorhídrico 0,1-n (36 mmoles), se agita durante algunos minutos y la solución turbia se filtra a través de un filtro de vacío de vidrio G-4. El residuo de filtración se disuelve en otros 250 cc de agua y se filtra al primer filtrado. Este se congela y se liofiliza. Después de equilibrar con humedad del aire se obtienen 27,0 g de trihidrocloruro de calcitonina M.

El producto presenta los siguientes datos analíticos:

30 Cromatograma de capa delgada sobre celulosa (Merck):

Rf = 0,61 en el sistema 101A
0,52 en el sistema 45
0,51 en el sistema 114
0,72 en el sistema 79 sobre óxido de aluminio con un
5 8 % de yeso.

En la electroforesis de capa delgada aparece una mancha con un trayecto de migración de 4,8 cm en dirección hacia el cátodo sobre placas de celulosa (Merck) y a un pH de 1,9; 9 V/cm y 3,5 horas de tiempo de traslación.

10 Contenido en ácido acético (por cromatografía de gas): <0,05%
Contenido en agua según Karl Fischer: 8,5 %
Contenido en cloro: 2,80% (calculado sobre trihidrocloruro anhidro: 3,02 %)

UV (en ácido acético al 10 %): $\lambda_{\max} = 275 \text{ nm}$, $\epsilon = 1440$

15 El producto de partida empleado en los ejemplos 3, 4 y 5 se puede obtener como descrito en la publicación alemana 2 413 106 (correspondiente a la patente belga nº 812 881).

Ejemplo 3

20 Trihidrocloruro de Asn²⁶-Thr²⁷-calcitonina M puro

1. Trifluoracetato de Asn²⁶-Thr²⁷-calcitonina M, en bruto
5,8 g (1,41 mmoles) de Boc-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(t-Bu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(Boc)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-
25 Thr(tBu)-Asn-Thr(tBu)-Gly-Val-Gly-Ala-pro-NH₂ se disuelven bajo nitrógeno en 70 cc de ácido trifluoroacético al 85 % de 0° y después se agita durante 2 horas a 29 - 31°. La solución se vierte en 600 cc de éter libre de peróxido y enfriado con hielo, bajo fuerte agitación, el precipitado formado

se separa por filtración y se seca en alto vacío.

2. Sal interna de Asn²⁶-Thr²⁷-calcitonina M

El precipitado secado obtenido bajo 1 se disuelve en 130 cc de agua, se filtra a través de una frita de vidrio G4 y con amoníaco diluido se precipita como sigue:

La solución se agita bajo nitrógeno a temperatura ambiente goteándose lentamente solución de amoníaco aproximadamente 1-n (t = 0,97). El pH se mide en forma continua mediante un electrodo de vidrio. La alimentación se regula de manera que en el plazo de unas 1,5 horas se alcance un pH de 5. En una ulterior hora se obtiene mediante adición continuada de amoníaco un pH de 6. Durante este tiempo comienza a precipitar la sal interna. Se continua goteando amoníaco diluido de manera que en el plazo de otra hora se forma un pH de 7,6.

A continuación se sigue agitando durante tres horas, se filtra y se lava bien con agua de un pH de 7,5 (ajustado con amoníaco). El residuo se seca en alto vacío.

3. Trihidrocloruro de Asn²⁶-Thr²⁷-calcitonina M

La sal interna insoluble en agua, obtenida según 2, se suspende en 80 cc de agua/t-butanol 1:1. Se agregan 39,0 cc de ácido clorhídrico 0,1-n, se agita durante algunos minutos bajo nitrógeno y se filtra. Se lava varias veces con un total de 120 cc de agua/terc.butanol 1:1 y se liofiliza. Se obtiene un liofilizado incoloro que se equilibra con humedad del aire. Rendimiento: 3,13 g.

El producto tiene los siguientes valores analíticos:

Cromatograma de capa delgada sobre celulosa (Merck):

Rf = 0,41 en el sistema 114

0,36 en el sistema 45

0,55 en el sistema 101 A

Rf = 0,49 en el sistema 52 sobre óxido de aluminio con un 8 % de yeso.

5 El trayecto de migración en la electroforesis de capa delgada sobre placas de celulosa (Merck) a un pH de 1,9 (ácido fórmico/ácido acético como tampón) 9 V/cm y 3,5 horas de tiempo de traslación es de 4,8 cm.

Ejemplo 4

Acetato de Thr²⁷-calcitonina M puro

10 80 mg de Thr²⁷-calcitonina M en bruto, sal ácido acética, se disuelven en 5 cc de agua y bajo agitación se mezcla con un total de 1,2 cc de intercambiador de iones Merck nº II, debilmente básico, forma de amina libre. Sube así el valor pH de la solución de originalmente 4,6 a 6,1. Se agita durante otras dos horas a temperatura ambiente, for-
15 mándose un precipitado coposo y aumentando el pH de la solución a 7,1. Se agita durante otros 30 minutos bajo este pH, el precipitado se separa por succión junto con el intercambiador de iones y se lava bien con agua. Después se separa el péptido del intercambiador de iones agitando la mezcla aún húmeda con 15 cc de ácido acético al 90% bajo calenta-
20 miento a 60° y separando por succión la solución ácido acética. La liofilización del eluado da 74 mg de acetato de Thr²⁷-calcitonina M de un grado de pureza muy alto. Valor Rf en la cromatografía de capa delgada sobre placas de celulosa en el sistema 52 = 0,50, Rf = 0,49 sobre placas de óxido de alu-
25 minio en el sistema 101A = 0,52 .

En la electroforesis de capa delgada (pH = 1,9; 280 V, 2 horas) se traslada el producto 4,4 cm hacia el cátodo. Contenido en ácido acético: 4,22 % (cromatografía de gas);

Contenido en agua: 7,78 % (Titración según Karl Fischer);
Contenido en péptido: 87,4 % (titrimetricamente); espectro
UV: λ_{max} = 276 nm; ϵ = 1560 (c = 2 en ácido acético al 5 %,
calculado sobre un contenido en péptido de 87,4 %). Propor-
5 ción molar de aminoácido después de la hidrólisis total (6-N.
HCl, 24 horas 110°) (los valores calculados entre paréntesis):
Lys: 0,93 (1); His: 0,95 (1); NH₃: 3,40 (4); Asp: 3,00 (3);
Thr: 5,23 (6); Ser: 1,17 (1); Gln: 2,02 (2); Pro: 2,06 (2);
10 Gly: 3,87 (4); Ala: 2,03 (2); 1/2(Cys)₂: 2,13 (2); Val: 1
(valor de referencia); Met: 1,07 (1); Leu: 1,82 (2); Tyr:
0,99 (1); Phe: 3,06 (3).

Ejemplo 5

Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Leu-Thr-Gln-Asp-
Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Asn-Thr-Gly-Val-Gly-
15 Ala-Pro-NH₂, acetato (Acetato de Leu¹²-Asn²⁶-Thr²⁷-calcito-
nina M)

170 mg de Boc-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-
Cys-Met-Leu-Gly-Thr(tBu)-Leu-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-
Lys(Boc)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Asn-Thr(tBu)-
20 Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ en 5 cc de ácido trifluoroacético al
90 % se dejan reposar durante 90 minutos a 25°, el trifluor-
acetato del péptido se precipita con éter libre de peróxido,
se separa por succión, se lava ulteriormente con éter, se se-
ca y se disuelve en ácido acético al 1%. Después se filtra
25 a través de una columna de intercambiador de iones Merck
(ligeramente básico, forma de acetato), se eluye con ácido
acético al 1 % y el eluado se liofiliza (116 mg). Para su
purificación se disuelve el acetato obtenido en 5 cc de agua
(pH de la solución = 4,2) y en porciones se agregan bajo agi-

tación en total 2,8 cc de intercambiador de iones Merck nº II (debilmente básico, forma de base). Sube así lentamente el pH de la solución y al alcanzar un valor de unos 6,7 comienza la precipitación del péptido libre. Se agita durante un total de 2 horas alcanzándose un pH de 7,1. Después se separan por succión el precipitado y el intercambiador de iones, se lava ulteriormente con agua y el péptido se separa por disolución del intercambiador de iones agitando con ácido acético al 90 % calentado a 60°. Se separa por succión, se lava ulteriormente con ácido acético al 90 % y se liofiliza. Se obtienen 98 mg de Leu¹²-Asn²⁶-Thr²⁷-calcitonina M como acetato de alta pureza.

DC: Rf (101A) = 0,33;

DA: Rf (52) = 0,47

15 Ejemplo 6

Calcitonina M (acetato) pura

110 mg de acetato de calcitonina M puro se disuelven en 5 cc de agua y a la solución se agregan, en porciones y bajo agitación, en el plazo de 1 hora 1,0 cc de intercambiador de iones Merck nº III, fuertemente básico. Sube así el pH de la solución a 6,6 y comienza la precipitación de la calcitonina. Después de seguir agitando a temperatura ambiente se eleva el pH de la mezcla a 7,3 donde se mantiene.

25 Se separa ahora por succión el intercambiador de iones junto con el péptido precipitado, se lava a continuación con agua y después se separa el péptido por disolución del intercambiador de iones agregando ácido acético al 90 % calentado. Se vuelve a separar por succión, se lava ul-

de la calcitonina M.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque como producto de partida se emplea una sal de un análogo de la calcitonina M.

5 4. Procedimiento según la reivindicación 2 ó 3, caracterizado porque como producto de partida se emplea una sal de un derivado desamino¹ de la calcitonina.

10 5. Procedimiento según la reivindicación 2 ó 3, caracterizado porque como producto de partida se emplea una sal de un derivado N^α-acílico de la calcitonina.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 - 5, caracterizado porque como producto de partida se emplea el péptido en bruto en forma de una sal con un hidrácido halogenado.

15 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 - 5, caracterizado porque como producto de partida se emplea el peptido en bruto en forma de un hidrocloruro.

20 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 - 5, caracterizado porque como producto de partida se emplea el péptido en bruto en forma del trifluoracetato.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 - 5, caracterizado porque como producto de partida se emplea el péptido en bruto en forma del acetato.

10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 9, caracterizado porque el pH del margen isoelectrico se gradúa mediante un ácido inorgánico o base.

11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 6 - 9, caracterizado porque el pH del margen isoelectrico se gradua con amoniaco acuoso.

12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 9, caracterizado porque el pH del margen isoelectrico se gradua mediante un intercambiador de iones.

13. Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado porque el péptido se separa del intercambiador de iones mediante transformación en una sal hidrosoluble.

14. Procedimiento para la purificación de calcitoninas, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria.

Esta memoria consta de 22 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

12 DIC. 1974

CIBA-GEIGY AG.

J. GOMEZ ACEDO Y BODET

p. Firmador L. Gaeta Fernández

